

УДК: 579.842.1/2 +579.61:616.34-002

## ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ НАНОЧАСТИНОК ХІТОЗАНУ, ЛЕГОВАНИХ Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ІОНАМИ

Суходуб Л.Б.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.  
І.Мечникова НАМН України»

Модифікація неорганічними біоактивними іонами матеріалів для ортопедичних імплантатів з метою ініціації контрольованих реакцій в тканинах, які оточують імплантат, є одним із сучасних підходів у медичному матеріалознавстві. Серед біополімерів велику наукову привабливість в області медицини, біотехнології, фармації, косметики має хітозан завдяки біосумісності з нативними тканинами макроорганізму, біодеградації, протимікробній активності. Багато наукових публікацій присвячено дослідженню комплексів хітозану та його похідних з металами, барвниками, ферментами [1, 2].

Похідні хітозану характеризуються ранозаживлюючими властивостями, оскільки вони проявляють більшу протимікробну активність порівняно з чистим хітозаном. Так, хітозан, модифікований етилдіамінтетраоцтовою кислотою, протимікробна дія якого полягає у зв'язуванні іонів магнію, що стабілізують зовнішню мембрану грам-негативних бактерій, застосовується у складі гідроспиртових гелів для зовнішнього застосування. Карбоксиметилхітозан приєднується до негативно зарядженої бактеріальної поверхні, порушуючи функціонування клітинної мембрани, його використовують для лікування парадонтальних карманів у стоматології [3].

Ключовою властивістю функціональних полімерів є їх здатність утворювати комплекси з різними іонами металів у розчинах. Хітозан - природний біополімер з яскраво вираженою спорідненістю до іонів перехідних металів.[4, 5]. З іонами металів хітозан утворює хелатні комплекси, деякі з них можуть проявляти і протимікробну активність [6, 7].

Амінополісахариди, до яких і належить хітозан, характеризуються наявністю атомів вуглецю, азоту, кисню у складі функціональних груп. Електронне оточення цих елементів залежить від зв'язків з іншими елементами глюкопіранозного кільця. В кислих середовищах з протонованими аміногрупами хітозану приєднання іонів металів відбувається шляхом донорно-акцепторної реакції між азотом та іоном металу [8].

В останні роки багато досліджень пов'язано з отриманням наночастинок різних матеріалів завдяки їх унікальним фізико-хімічним та біологічним властивостям [9]. Для подібних об'єктів характерна висока реакційна здатність і тому для їх стабілізації необхідні певні умови утримання [10]. Останнє забезпечується використанням полімерних сполук різного хімічного складу, в тому числі і високодисперсних гідрогелів, створених на основі

полімерів. Наночастинки як чистого хітозану, так і легованого іонами металів, можуть бути компонентами композиційних біоматеріалів медичного призначення, одночасно виконуючи протимікробну функцію.

Метою даної роботи стало дослідження протимікробної активності наночастинок хітозану, модифікованих іонами металів Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, щодо штамів мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження стали тестові штами мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653, отримані з Музею мікроорганізмів ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України" та наночастинки хітозану, модифіковані іонами металів Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>. З метою здійснення порівняльного аналізу досліджувались наночастинки чистого хітозану та іони вище вказаних металів у водних розчинах відповідних сполук.

Для проведення дослідження були використані наступні матеріали: хітозан (М.м.500кДа, ступінь деацетилювання 85%, виробник «Біопрогрес», Москва); м'ясо-пептонний бульон (МПБ) (М.001, виробник Індія); м'ясо-пептонний агар (МПА) (М.002, виробник Індія); хімічні реактиви AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O аналітичного ступеню чистоти.

При проведенні досліджень використовували одностовові культури мікроорганізмів. Приготування суспензії мікроорганізмів з концентрацією, яка відповідала 0,5 одиницям оптичної густини за шкалою Mc Farland, проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробник PLIVA-Lachema, Чехія, довжина хвилі 540 нм) згідно нормативних документів [11].

Суспензія наночастинок хітозану була отримана відомим методом іонотропного гелеутворення з використанням натрієвої солі триполіфосфату [12-14]. Для отримання металовмісних наночастинок хітозану до суспензії були додані водні розчини сполук металів в кількості, яка відповідала концентрації відповідних металічних іонів 200 ppm (мкг/мл). Суміш була піддана дії ультразвуку протягом 10 хвилин та 4-годинному перемішуванню в шейкері (200 кол/хв), після чого ретельно промита деіонізованою водою та центрифугована для розділення твердої і рідкої фракцій. Додатково були приготовані водні розчини досліджуваних сполук металів з концентрацією 200 та 1000 ppm для порівняльного експерименту. Частина отриманого матеріалу була ресуспендована в деіонізованій воді, заморожена та ліофільно висушена в вакуумі 0,45 Мбар при температурі (-180)°C для подальших інструментальних досліджень, проведених з використанням обладнання лабораторії «Біонаноккомпозит» Сумського державного університету. Так, рентгено-флюоресцентним аналізом досліджуваних зразків, виконаним на спектрометрі «Elvax-light» (Україна, Київ), було підтверджено входження іонів металів в структуру хітозану. Електронно-мікроскопічні дослідження структури і

фазового складу зразків з допомогою просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К ("SELMI", Суми, Україна) підтвердили утворення наночастинок хітозану з середнім розміром 30 нм, та показали, що додавання до реакційної суміші іонів металів призводить до збільшення густини утвореної суспензії наночастинок. Дослідження, проведені з допомогою інфрачервоного спектрометра на основі Фур'є перетворення Agilent Cary 63 FTIR (компанія Agilent Technologies, США) засвідчили структурні зміни в молекулі хітозану після іонного гелеутворення та участь його функціональних груп у комплексоутворенні з іонами металів. Детальний опис результатів інструментальних досліджень приведений в опублікованій раніше роботі [15]. Вивчення чутливості мікроорганізмів проводили методом двократних серійних розведень в рідкому поживному середовищі [16]. Під час дослідження отримані суспензії додавали до пробірок з МПБ з розрахунку 1мл:1мл. В якості контрольного зразка брали розчин оцтової кислоти з концентрацією 1 мас. %. В пробірках готували ряд двократних розведень препарату об'ємом по 2 мл. Після цього в кожну пробірку, в тому числі і контроль, вносили по 0,2 мл мікробної зависі тест-штаму з концентрацією, яка відповідала 0,5 одиницям за шкалою McFarland. Посіви розміщували в термостаті на 16 годин при температурі 37 °С, результати визначали візуально за наявністю або

відсутністю каламутності середовища в пробірках. Концентрація препарату в останній пробірці з прозорим середовищем (відсутність видимого неозброєним оком росту тест-штаму відповідала мінімальній інгібуючій концентрації (МІК) препарату. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК) з 2-3 останніх пробірок з прозорим середовищем проводився висів 0,1 мл вмісту кожної пробірки на чашки з МПА. Після витримування в термостаті протягом 18-24 годин при 37 °С визначалась та мінімальна концентрація препарату, висів з якої не давав росту. Дана кількість препарату відповідає його МБЦК.

### Результати та обговорення

Протимікробна активність наночастинок хітозану, модифікованих іонами срібла, міді, цинку та магнію була досліджена шляхом визначення їх МІК та МБЦК та порівнянням зі значеннями МІК та МБЦК наночастинок хітозану (без додавання іонів металів) та розчину оцтової кислоти з концентрацією 1 мас. %, яка є розчинником хітозану. Результати досліджень приведені в таблиці 1.

Дослідження показали значно більшу протимікробну активність порівняно з контролем (1 мас. % оцтова кислота), як наночастинок чистого хітозану, так і модифікованих металічними іонами, що є фактом протимікробної активності саме досліджуваного матеріалу, а не розчинника.

**Таблиця 1 – Протимікробна активність наночастинок хітозану, в тому числі легованих іонами металів**

Тип зразку	Вміст іонів металу, ppm	Протимікробна активність, ppm					
		<i>E. coli</i> ATCC 5922		<i>S. aureus</i> ATCC 5923		<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	
		МІК	МБЦК	МІК	МБЦК	МІК	МБЦК
Ch	-	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	6,25
Ch+Ag <sup>+</sup>	200,0	0,8	0,8	1,6	3,2	3,2	3,2
Ch+Cu <sup>2+</sup>	200,0	6,25	6,25	1,6	6,25	25,0	25,0
Ch+Zn <sup>2+</sup>	200,0	3,1	3,1	6,25	6,25	25,0	25,0
Ch+Mg <sup>2+</sup>	200,0	3,1	>200,0	12,5	25,0	25,0	25,0
CH <sub>3</sub> COOH	-	312,0	625,0	625,0	1250,0	625,0	1250,0

Також була визначена МІК та МБЦК відповідних іонів металів. Результати досліджень приведені в таблиці 2. Слід відзначити, що для визначення протимікробної активності іонів металів були підготовані розчини металовмісних сполук з концентраціями відповідних іонів 200 ppm. При

цьому мікроорганізми не проявили чутливості до ряду зразків. Тому вказану концентрацію металічних іонів було збільшено спочатку до 500 ppm, а потім до значення, рівного 1000 ppm. Однак, навіть при такій концентрації всі досліджувані мікроорганізми не виявили чутливості щодо іонів магнію.

**Таблиця 2 – Протимікробна активність іонів металів**

Тип зразку	Концентрація іонів металу, ppm	Протимікробна активність, ppm					
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	
		МІК	МБЦК	МІК	МБЦК	МІК	МБЦК
Ag <sup>+</sup>	1000,0	3,9	62,5	62,5	62,5	31,2	125,0

Cu <sup>2+</sup>	1000,0	125,0	250,0	250,0	250,0	62,5	>1000
Zn <sup>2+</sup>	1000,0	125,0	>1000	125,0	125,0	62,5	>1000
Mg <sup>2+</sup>	1000,0	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

У більшості випадків суспензії наночастинок, модифікованих іонами металів, проявляли сильнішу протимікробну дію, ніж суспензія наночастинок чистого хітозану і перевищували протимікробну активність відповідних іонів металів. Найбільш чутливим до всіх досліджуваних зразків виявився мікроорганізм *E. coli* ATCC 25922, а найменш вразливим – *C. albicans* ATCC 885653. Так, наприклад, наночастинок хітозану, легованих іонами Ag<sup>+</sup>, були активнішими в порівнянні з наночастинками чистого хітозану щодо мікроорганізмів *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* в 8, 4, 2 рази відповідно, а в

порівнянні з активністю іону Ag<sup>+</sup> – в 5, 40, 10 разів відповідно. Додавання іонів міді Cu<sup>2+</sup> збільшувало протимікробну дію наночастинок хітозану щодо *S. aureus* в порівнянні з наночастинками чистого хітозану в 4 рази, при цьому не впливало на протимікробну активність щодо двох інших досліджуваних мікроорганізмів. Додавання іонів цинку (Zn<sup>2+</sup>) та магнію (Mg<sup>2+</sup>) підвищувало протимікробну активність наночастинок хітозану щодо *E. coli* у 2 рази.

На рисунку показані гістограми, які демонструють протимікробну активність наночастинок чистого хітозану, хітозану, легованого іонами Zn<sup>2+</sup> та Ag<sup>+</sup> та відповідних металічних іонів.

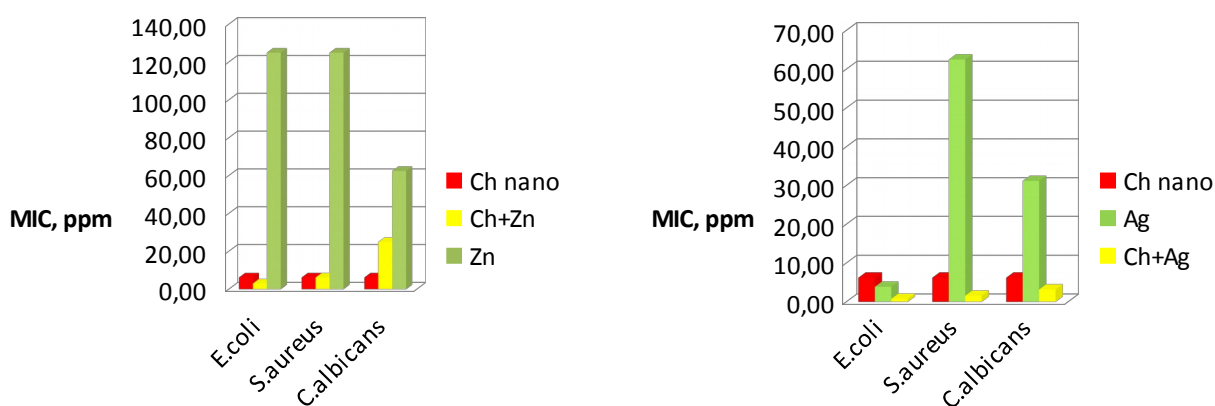


Рис. МІК (ppm) легованих іонами цинку та срібла наночастинок хітозану в порівнянні з наночастинками чистого хітозану та іонами вказаних металів щодо мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885-653.

Отримані результати не суперечать літературним даним [17] та пояснюються тим, що хітозан в розчині оцтової кислоти набуває позитивного заряду за рахунок протонування функціональної аміногрупи NH<sub>2</sub>. Позитивно заряджені групи хітозану, приєднуючись до негативно зарядженої поверхні мікробної клітини, порушують її метаболізм [18]. Очевидно, що іони металів, додані до розчину хітозану, «зшивають» його молекули перетворюючи структуру у більш щільну, в результаті чого збільшується ефект протимікробної дії.

Таким чином, дослідження *in vitro* протимікробної активності наночастинок хітозану показало, що у більшості випадків суспензії наночастинок, легованих іонами металів, проявляли сильнішу протимікробну дію, ніж суспензія наночастинок чистого хітозану і перевищували протимікробну активність відповідних іонів металів. Результати даного дослідження свідчать про перспективність застосування наночастинок хітозану, легованих іонами Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, в якості протимікробної складової для композитних матеріалів медичного призначення.

#### References

1. Trimukhe, K. D. Metal complexes of crosslinked chitosans: Correlations between metal ion complexation values and thermal properties [Text] / K. D. Trimukhe, A. J. Varma // Carbohydrate Polymers. – 2009. – V.75 – p.63–70.
2. Sanpui, P. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite [Text] / Pallab Sanpui, A. Murugadoss, P. V. Durga Prasad, Siddhartha Sankar Ghosh, Arun Chattopadhyay // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – V.124. – p. 142–146.
3. Alves, N. M. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. Review [Text] / N. M. Alves, J. F. Mano // International Journal of Biological Macromolecules. – 2008. – V.43. – p. 401–414.
4. Rakesh, N. Shinde Chitosan-transition metal ions complexes for selective arsenic(V) preconcentration [Text] / Rakesh N. Shinde, A. K. Pandey, R. Acharya, R. Guin, S. K. Das, N. S. Rajurkar, P.K. Pujari // Water research . – 2013. – V.47. – p. 3497 – 3506.
5. Xionga, C. Adsorption behavior of Hg<sup>2+</sup> in aqueous solutions on a novel chelating cross-linked chitosan microsphere [Text] / Chunhua Xionga, Leilei Pi, Xinyi

- Chena, Liqun Yanga, Chunan Mab, Xuming Zhengc // Carbohydrate Polymers. – 2013. – V.98. – p. 1222–1228.
6. Wang, X. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex [Text] / Xiaohui Wang, Yumin Du, Hui Liu // Carbohydrate Polymers. – 2004. – V. 56. – p.21–26.
7. Higazy, A. Development of antimicrobial jute packaging using chitosan and chitosan–metal complex [Text] / Asha Higazy, Mohamed Hashem, Ali ElShafei, Nihal Shaker, Marwa Abdel Hady // Carbohydrate Polymers. – 2010. – V.79. – p. 867–874.
8. Dambies, L. Characterization of metal ion interactions with chitosan by X-ray photoelectron spectroscopy [Text] / Laurent Dambies, Claude Guimon, Sotira Yiacoemic, Eric Guibal // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 200. – V.177. – p.203–214.
9. Nanotechnology in the next decade. Forecast research directions [Text] / [J. Whitesides, D. Eglar, P. Anders, etc.]; Ed. M. C. Roko, R. S. Williams, and P. Alivisatos. Lane. engl.-M.: Mir. 2002. –292p.
10. Nanochemistry. Nanosystems. Nanomaterials [Text] / [Volkov, S. V., Kovalchuk, E. P., Ogenko, V. M., Reshetnyak, O. V.]. – K.: Naukova dumka, 2008. – 423p.
11. Standardization of the preparation of microbial suspensions[Text]: information letter / Ministry of public health of Ukraine. - Kyiv, 2006. – No. 163.
12. Guibal, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review [Text] / Eric Guiba 1 // Separation and Purification Technology. – 2004. – V.38. – p.43–74.
13. López-León, T. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles:electrokinetic and stability behavior [Text] / T. López-León, E. L. S. Carvalho, B. Seijo, J. L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González // Journal of Colloid and Interface Science. – 2005. – V.283. – p. 344–351.
14. Ilyina, A. V. Natural polymer Chitozan for forming nanoparticles [Text] /A. V. Ilyina, V. P. Varlamov, Y. A. Ermakov // Far East Academy of Sciences – 2008. –V. 421, No. 2. – p. 199 –201.
15. Sukhodub, L. B. Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles [Text] / L. B. Sukhodub // Journal of Nano and Electronic Physic. – 2014. - V.6 № 4. – p. 04034 – 04040.
16. On approving the instructions «Determination of susceptibility of microorganisms to antibacterial drugs "[Text]: the order of the MH of Ukraine from 05.04.2007 № 167 // Medicine and pharmacy news. – 2007. – No. 18. – p. 1-7.
17. Du, Wen-Li Antibacterial activity of Chitosan nanoparticles loaded with various metal ions [Text] / Wen-Li Du, Shan-Shan Niu, Ying-Lei Xu, Zi-Rong Xu, Cheng-Li Fan // Carbohydrate Polymers. – 2009. – V.75. – p.385 – 389.
18. Singla, A. K. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects- an update [Text] / Singla, A. K., Chawla, M.// J. Pharm. Pharmacol. – 2001. – V.53. – p.1047-1067.

**УДК: 579.842.1/2 +579.61:616.34-002**  
**ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ**  
**НАНОЧАСТИНОК ХІТОЗАНУ, ЛЕГОВАНИХ  $Ag^+$ ,**  
 **$Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ИОНАМИ.**

**Суходуб Л.Б.**

Модифікація біополімерами та неорганічними іонами металів для ортопедичних імплантатів є одним із сучасних підходів у медичному матеріалознавстві. В даній роботі було досліджено протимікробну активність наночастинок хітозану, модифікованих іонами металів  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  по відношенню до референтних штамів мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653 шляхом визначення їх МІК та МБцК з метою їх подальшого використання в якості компонентів при створенні композиційних біоматеріалів медичного призначення. Доведено, що у більшості випадків суспензії наночастинок, модифікованих іонами металів, проявляли сильнішу протимікробну дію, ніж суспензія наночастинок чистого хітозану, і значно перевищували протимікробну активність відповідних іонів металів.

*Ключові слова:* хітозан, наночастинки, іони металів, протимікробна активність, штами мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885-653, протимікробна активність.

**УДК: 579.842.1/2 +579.61:616.34-002**  
**ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ**  
**НАНОЧАСТИЧЕК ХИТОЗАНА,**  
**ЛЕГИРОВАННЫХ  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ИОНАМИ**  
**Суходуб Л.Б.**

Модификация полимерами и неорганическими биоактивными ионами материалов для ортопедических имплантатов является одним из современных подходов в медицинском материаловедении. В данной работе была исследована противомикробная активность наночастичек хитозана, модифицированных ионами металлов  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  по отношению к референтным штаммам микроорганизмов *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653 путем определения МИК и МБцК с целью дальнейшего их использования в качестве компонентов при создании композиционных биоматериалов медицинского назначения. Доказано, что в большинстве случаев суспензии наночастиц, легированных ионами металлов, обладали более выраженным противомикробным эффектом, чем суспензия наночастиц чистого хитозана и значительно превышали противомикробную активность соответствующих ионов металлов.

*Ключевые слова:* хитозан, наночастицы, ионы металлов, штаммы микроорганизмов *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653, антимикробная активность.

**UDK: 579.842.1/2 +579.61:616.34-002**  
**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,**  
 **$Mg^{2+}$  IONS DOPED CHITOSAN NANOPARTICLES**  
**Sukhodub L.B.**

Modification by polymers and inorganic ions of the bioactive materials for orthopedic implants with the

purpose of initiating controlled reactions in tissues that surround the implant, is one of the modern approaches in medical materials. A key feature of functional polymers is their ability to form complexes with various metal ions in solution. Chitosan is natural biopolymer with pronounced affinity to transition metal ions. Some researches prove the higher antimicrobial activity of Chitosan-metal complexes compared with pure Chitosan. The purpose of this work was the study of antimicrobial activity of Chitosan nanoparticles modified by metal ions  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  against reference strains *S. aureus* 25923 ATSS, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653 for their further use as components of the composite biomaterials for medical purpose. Chitosan nanoparticles suspension was prepared by known method based on the ionotropic gelation between chitosan and sodium tripolyphosphate. To obtain Chitosan-metal nanoparticles to the Chitosan suspension were added the corresponding metal ions aqueous solutions in quantity to match the concentration of metal ions of 200 ppm. Antibacterial activities of  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ions doped Chitosan nanoparticles, pure Chitosan nanoparticles, metal ions and 1% (v/v) acetic acid solution (it was used as solvent for Chitosan) against bacteria were evaluated by determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) *in vitro*. Muller–Hinton (MH) broth and MH agar (Russia) were used as growth media. The bacteria suspension for further use was prepared with concentration that corresponded 0,5 units by McFarland scale. The MIC was determined by a broth dilution method. The results were read after 24 hours of experimental tubes incubation at 37 °C as equivalent to the concentration of the tube without visible growth. To evaluate MBC, a sample of 0,1 ml was transferred from each tube without visible growth to a MH agar plate and incubated at 37 °C for another 24 hours. The MBC was determined as the concentration of the tube without bacterial growth. Results showed that antibacterial activity of the ion metal loaded Chitosan nanoparticles was higher than that of pure Chitosan nanoparticles and significantly higher than antibacterial activity of the metal ions. The acetic acid MIC was highest and there is the evidence of the nanoparticles antibacterial action, but not of the solvent. The most sensitive to all investigated samples was gram-negative microorganism *E. coli* ATCC 25922, the most stable – funge *C. albicans* ATCC 885653. So, for example, Silver nanoparticles compared with pure Chitosan nanoparticle were at 8, 4, 2 times more active against *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* respectively, as compared with the  $\text{Ag}^+$  ion antibacterial activity – at 5, 40 and 10 times respectively. Adding copper ions  $\text{Cu}^{2+}$  to Chitosan nanoparticles increased their antimicrobial action against *S. aureus* compared with pure Chitosan nanoparticles in 4 times, but it does not affect antimicrobial activity against the other two of the microorganisms. Addition of zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) and magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ions increased antimicrobial activity against *E. coli* in 2 times. The results of this study suggest about the perspective of  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ions doped Chitosan

nanoparticles applications as the antimicrobial component to composite materials for medical purpose.

*Key words:* Chitosan, nanoparticles, metal ions, microbial strains *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 885653, antimicrobial activity